

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

マルチスケールイメージングによる大脳基底核の機能解明

研究代表者 小山内 実 1) 2) 3) 4)

研究分担者 笹岡 俊邦 5)

1) 大阪大学大学院医学系研究科 2) 東北大学大学院医学系研究科 3) 情報通信研究機構・大阪大学 脳情報通信融合研究センター 4) 理化学研究所 脳神経科学研究センター 5) 新潟大学脳研究所

研究要旨

脳は複雑な階層構造を成しており、その動作原理の理解のためには、多階層に渡るマルチスケール計測が必要である。そこで、MRI による全脳神経活動計測と、光学 Ca^{2+} イメージングを組み合わせた、マルチスケールイメージングにより、大脳基底核の機能解明を目指した。in vitro 神経活動計測としての Ca^{2+} イメージングにより、ドーパミンが皮質からの入力に対する D1-MSN の応答を低下させることが分かった。非侵襲全脳神経活動計測としての、定量的活動依存性マンガン造影 MRI を用いて、協調運動時の全脳神経活動計測に成功した。また、この協調運動時の全脳神経活動計測を健常動物とパーキンソン病モデル動物とで比較することに成功した。これらの研究により、大脳基底核におけるドーパミンの作用を精査した。

A. 研究目的

大脳基底核線条体におけるドーパミンの枯渇により、パーキンソン病が発症することから、ドーパミン受容体は大脳基底核の機能発現に重要な役割を果たしている。このドーパミンの機能を明らかにするために、線条体の投射ニューロンである、直接路ニューロン (D1-MSN) 及び間接路ニューロン (D2-MSN) の神経活動に対するドーパミンの作用を明らかにする。また、in vivo でのドーパミンの作用を明らかにするために、マウスの黒質緻密部ドーパミンニューロンが減少するパーキンソンモデルを作成し、協調運動課題中の全脳神経活動を健常動物と比較する。これらの研究により、大脳基底核の機能発現に対するドーパミンの役割の解明を目指す。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

本研究は大阪大学遺伝子組換え実験安全委員

会、同動物実験委員会の許可を得て行った。

(1) D1-MSN 及び D2-MSN の神経活動に対するドーパミンの作用

D1-MSN に YFP を発現している *Drd1*-YFP マウス及び D2-MSN に YFP を発現している *Drd2*-YFP マウスの急性脳スライス標本を作製し、皮質-線条体路刺激により惹起される線条体投射ニューロンの神経活動を、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Fura-2 LR を用いた Ca^{2+} イメージング法により計測した。

また、新潟大学脳研究所から譲受頂いた *D2*-iCre マウスと *flxed*-*G-CaMP8.5* を交配することで *D2*-MSN に *G-CaMP8.5* を発現させ、Fura-2 LR との差異を検討した。

(2) 協調運動時の神経活動にドーパミンが与える影響の検討

MPTP を腹腔内投与することによりパーキンソ

ン病モデルマウスを作成した。このパーキンソン病モデルマウスと健常マウスに対して、協調運動課題としてのローターロッドテストの訓練を行い、その後 $MnCl_2$ を腹腔内投与し、ローターロッドテストを行い、その後の MRI 撮像により Mn^{2+} の脳内蓄積量を定量化する定量的活動依存性マンガン造影 MRI (qAIM-MRI) を実施し、協調運動時の全脳神経活動計測を行った。

C. 研究結果

(1) D1-MSN 及び D2-MSN の神経活動に対するドーパミンの作用

Drd1-YFP マウス及び Drd2-YFP マウスの急性線条体脳スライス標本の皮質-線条体路に様々な周波数の電気刺激を与え、シナプス後細胞である D1-MSN と D2-MSN の神経活動を Ca^{2+} イメージングにより計測した。その結果、D2-MSN の神経活動が D1-MSN の神経活動より低いことが分かった。この標本に対してドーパミンを投与したところ、D1-MSN では神経活動が低下したが、D2-MSN では有意な変化はなかった。

D2-MSN に G-CaMP8.5 を発現するマウスの線条体脳スライス標本を用いて、上記と同様の実験を行った結果、D2 ニューロンの神経活動計測を行うことができた。また、従来用いていた Fura-2 LR と G-CaMP8.5 の応答特性を比較した結果、G-CaMP8.5の方が感度は高いが強い入力に対してサチュレーションしやすいことが明らかとなった。

(2) 協調運動時の神経活動にドーパミンが与える影響の検討

ローターロッド中の神経活動計測を qAIM-MRI により行うことに成功した。

マウスへの MPTP 投与により、黒質緻密部のドーパミンニューロンの数、及び線条体におけるドーパミン産生酵素チロシン水酸化酵素 (TH) の発現、の両者が有意に低下していた。この結果は MPTP 投与によりパーキンソン病モデル動物の作成に成功したことを示している。

健常動物と、パーキンソン病モデル動物との両者でローターロッドテスト中の全脳神経活動履歴を qAIM-MRI により計測することに成功した。

D. 考察

(1) D1-MSN 及び D2-MSN の神経活動に対するドーパミンの作用

急性脳スライス標本に対する Ca^{2+} イメージングにより、ドーパミンが D1-MSN の入力応答性を低下させ、D2-MSN にはほとんど作用がないことが分かった。この結果、ドーパミンが D1-MSN の活動を亢進させ、D2-MSN の活動を抑制する、という従来の説とは異なる。その理由について、今後更なる検討が必要である。

(2) 協調運動時の神経活動にドーパミンが与える影響の検討

qAIM-MRI により協調運動時の全脳神経活動計測に成功すると共に、MPTP 投与によるパーキンソン病モデル動物と健常動物の運動時神経活動の比較に成功した。従来の神経活動計測法では、運動時の神経活動計測は困難であったため、この手法の成功は画期的である。今後更なる検討を行い、ドーパミンが運動時神経活動に与える影響を明らかにする必要がある。

E. 結論

Ca^{2+} イメージング法により、D1-MSN 及び D2-MSN の皮質からの入力による神経応答に対するドーパミンの作用を計測することに成功した。

qAIM-MRI による全脳神経活動履歴計測法により、運動時の全脳神経活動履歴の計測に成功した。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表

1. 小山内 実. マルチスケールイメージングによる脳機能発現メカニズムの解明. 生産と技術 76(2): 85-89, 2024.

2. 学会発表

1. 小山内 実. カルシウムイメージング - その利点と注意点 -. 第 62 回日本生体医工学会大会 オーガナイズドセッション「神経工学の目指す先」, 名古屋,

- 2023/5/18-20.
2. 小山内 実. 脳と生体の因果循環を紐解く多階層・多次元神経活動計測法の開発. 第 46 回日本神経科学大会 公募シンポジウム「部分と全体の因果循環から脳機能を読み解く基盤技術を目指してマルチスケール計測」, 仙台, 2023/8/1-4.
 3. 藤江 春花, 末岡 知己, 田村 篤史, 小林 和人, 小山内 実. 線条体投射ニューロンの周波数応答特性に対するドーパミンの作用. 第 46 回日本神経科学大会, 仙台, 2023/8/1-4.
 4. 小山内 実, 上村 優輝, 松下 知佳, 西澤 佳代, 圓見純一郎, 吉岡 芳親, 小林 和人. 協調運動下の全脳神経活動. 第 37 回日本大脳基底核研究会, 旭川, 2023/8/19-20.
 5. 安藤 真実, 藤江 春花, 末岡 知己, 田村 篤史, 小林 和人, 小山内 実. 線条体投射ニューロンの入出力関係に対するドーパミンの作用. 2023 年 電気学会電子・情報・システム部門大会, 札幌, 2023/8/30-9/1.
 6. 古澤 唯夏, 上村 優輝, 松下 知佳, 西澤 佳代, 圓見 純一郎, 吉岡 芳親, 小林 和人, 小山内 実. 定量的活動依存性マンガン造影 MRI による協調運動下の全脳神経活動計測. 第 115 回 近畿生理学談話会, 吹田, 2023/11/11.
 7. 安藤 真実, 藤江 春花, 末岡 知己, 田村 篤史, 小林 和人, 小山内 実. 線条体投射ニューロンの活動に対するドーパミンの影響. 第 115 回 近畿生理学談話会, 吹田, 2023/11/11.
 8. 小山内 実. マルチスケールイメージングによる大脳基底核の機能解明. 2023 年度 脳研共同利用共同研究 笹岡班合同セミナー, 新潟 (ハイブリッド), 2024/1/31.
 9. 藤江 春花, 安藤 真実, 末岡 知己, 田村 篤史, 小林 和人, 小山内 実. 線条体投射ニューロンの活動に対するドーパミン・アゴニスト、アンタゴニストの影響. 2023 年度 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会, 大津, 2024/2/8-9.
 10. 小山内 実. 健常と PD の神経活動の違いは自由行動時と協調運動時とで異なる. 令和 5 年度大脳基底核機能研究会. 高槻, 2024/3/22-23.
 11. 古澤 唯夏, 上村 優輝, 西澤 佳代, 松下 知佳, 圓見 純一郎, 田村 篤史, 吉岡 芳親, 小林 和人, 小山内 実. 定量的活動依存性マンガン造影 MRI による随意運動時の全脳神経活動の可視化. 第 101 回日本生理学会大会, 北九州, 2024/3/28-30.
 12. 安藤 真実, 藤江 春花, 末岡 知己, 田村 篤史, 小林 和人, 小山内 実. 線条体投射ニューロンの活動に対するドーパミンの影響. 第 101 回日本生理学会大会, 北九州, 2024/3/28-30.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし